

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan rancangan *post test only control group design*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang selama 35 hari pada bulan April 2018 sampai bulan Mei 2018.

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*).

4.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) yang memenuhi kriteria inklusi.

4.3.3 Besar sampel

Penelitian ini menggunakan total lima kelompok perlakuan yang terdiri dari satu kelompok control negatif (-), satu kelompok kontrol positif (+) (diberi isoniazid + rifampisin) dan tiga kelompok perlakuan (diberi isoniazid + rifampisin dan ekstrak buah cepokak [*Solanum torvum Swartz*] dengan dosis bertingkat). Untuk menentukan jumlah tikus yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini, berdasarkan pada rumus Federer = $(n-1)(t-1) \geq 15$ (Notoatmodjo, 2010), dengan n = besar sampel, dan t = banyaknya variabel perlakuan.

Maka banyak sampel yang dibutuhkan:

$$(n-1)(t-1) \geq 15 \quad = \quad (n-1)(5-1) \geq 15 \quad = \quad 4n - 4 \geq 15 \quad =$$

$$n \geq 4,75 \approx 5$$

Dilanjutkan dengan rumus *Resource Equation Method*

$$E (\text{besar sampel}) = (n \times \sum \text{kelompok perlakuan}) - \sum \text{kelompok perlakuan}$$

$$E = (5 \times 5) - 5$$

$$E = 25 - 5 = 20 \text{ (besar sampel minimal yang dibutuhkan pada penelitian)}$$

Kemudian perhitungan estimasi cadangan

$$n' (\text{Jumlah sampel penelitian}) = \frac{n (\text{besar sampel})}{1-f(\text{perkiraan proporsi drop out, kira-kira } 10\%)}$$

$$n' = \frac{5}{1-0,1}$$

$$n' = \frac{5}{0,9} = 5,6 \approx 6$$

$$\text{Cadangan untuk 1 kelompok: } n' - n = 6 - 5 = 1$$

$$\text{Cadangan untuk 5 kelompok: } 1 \times 5 = 5$$

Setelah menggunakan rumus Federer dan dilanjutkan dengan rumus *Resource Equation Method* didapatkan jumlah minimal 20 ekor tikus yang dibutuhkan untuk penelitian, ditambah dengan lima ekor tikus sebagai cadangan. Sehingga total jumlah sampel tikus yang dibutuhkan adalah 25 ekor tikus dan kemudian dibagi menjadi lima kelompok perlakuan yang setiap kelompoknya terdiri dari lima ekor tikus.

4.3.4 Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Purposive sampling*.

4.3.5 Karakteristik sampel penelitian

4.3.5.1 Kriteria inklusi

1. Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain Wistar*)
2. Umur 2 – 3 bulan
3. Berat badan 150 – 200 gram
4. Kondisi sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif, mata yang jernih, dan bulu yang tebal.

4.3.4.2 Kriteria eksklusi:

1. Tikus yang cacat (ekor terbelah dua, mata buta) sebelum perlakuan
2. Tikus yang sudah pernah dipakai dalam penelitian.

4.3.5.2 Kriteria *drop out*

1. Tikus mati selama proses penelitian
2. Tikus sakit selama proses penelitian yang ditandai dengan gerakan tidak aktif, tidak mau makan dan minum, serta rambut kusam dan rontok, diare/ feses lunak (Koolhas, 2010).

4.3.6 Variabel penelitian

4.3.6.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak buah cepokak (*Solanum torvum Swartz*).

4.3.6.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar MDA hepar tikus jantan strain wistar yang diinduksi INH dan RIF.

4.3.6.3 Variabel Perancu

Variabel perancu pada penelitian ini adalah lingkungan (suhu, cahaya, kelembaban), perlakuan (penyondean, membersihkan kandang, pengambilan preparat hepar).

4.3.7 Definisi operasional variabel

Tabel 4.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional Variabel	Hasil Ukur (Indikator) Variabel	Cara Ukur Variabel	Alat Ukur	Skala Ukur Variabel
Variabel Bebas						
1.	Ekstrak buah cepokak (<i>Solanum torvum Swartz</i>)	Ekstrak buah cepokak (<i>Solanum torvum Swartz</i>) diekstrak dengan menggunakan metanol 100% dan didapatkan dari UPT Materia Medika Batu.	Dosis I: 50mg/200g II: 100mg/200g III: 150mg/200g (Ramamurthy <i>et al</i> , 2016).	Diberikan secara per oral dengan sonde setiap hari selama 28 hari, 2 jam setelah pemberian induksi obat isoniazid dan rifampisin.	Timbangan (Miligram <i>Balance</i>)	Kategorik: Ordinal

Variabel Tergantung						
1.	Kadar malondialdehida (MDA)	Produk akhir peroksidasi lipid sel hepar	Hasil pengukuran dengan spektrofotometri dalam satuan ng/ml.	Pengukurannya dengan cara pengambilan jaringan hepar tikus jantan strain wistar untuk mengukur MDA melalui tes TBARS dengan metode spektrofotometri	Spektofotometri	Numerik: Rasio

4.4 Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1 Alat

A. Alat pemeliharaan tikus

1. Kandang pemeliharaan
2. Tutup kandang
3. Tempat makan
4. Tempat minum

B. Alat pemberian perlakuan

1. Handscoon
2. Sonde

C. Alat pembedahan tikus

1. Minor set
2. Jas laboratorium
3. Papan bedah
4. Handscoon
5. Jarum pentul
6. Tabung pembius tikus

D. . Alat pengukuran MDA

1. Apendorf
2. Batang pengaduk
3. Beker glass 250 ml
4. Beker glass 1000
5. Blender
6. Cawan porselen
7. Homogenizer
8. Labu ukur 5 dan 10 ml
9. *Sentrifuge*
10. Spektrofometer ultrospec 3000 pro uv/visible
11. *Waterbath*

E. Alat lain

1. Kapas
2. Kamera
3. Label

4. Timbangan

4.4.2 Bahan

A. Bahan pakan tikus

1. Bahan pakan (BR-1): Air 12%; protein kasar 20-22%; lemak kasar $\geq 5\%$; abu $\leq 7,5\%$; Ca 0,9-1,2%; P 0,6-0,8%; coccidiostat positif; antibiotika positif.
2. Aquadest
3. Masker

B. Bahan untuk pemberian perlakuan

1. Ekstrak buah cepokak (*Solanum torvum* Swartz) (methanol 100%)
2. Isoniazid paten 300 mg
3. Rifampisin paten 450 mg
4. Aquadest

C. Bahan pembedahan tikus

1. Kloroform
2. NS
3. Aquadest

D. Bahan pengukuran MDA

1. 100 ml Na-Thio 1 %
2. 100 ml TCA 10%

3. 100 ml HCL 1 N
4. 550 ml aquades
5. 200 mg jaringan hepar untuk analisis MDA

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Tahap aklimatisasi dan pengelompokan tikus

4.5.1.1 Tahap aklimatisasi

1. Menimbang berat badan tikus kemudian diberi tanda dengan cat. Pengecatan diberikan pada bagian ekor tikus agar mudah terlihat, sehingga mudah dalam perlakuan.
2. Memasukan tikus ke kandang yang terbuat dari bahan yang mudah dibongkar pasang, yaitu dari bak plastik yang ditutup dengan kawat. Hal ini dimaksudkan agar tikus tampak dari luar, sehingga mudah dalam mengamati tikus dan mengambil tikus karena dapat dibuka dan ditutup dengan mudah. Kandang diberi sekam sebagai alas tidur tikus, sehingga tikus merasa nyaman. Sekam sebagai alas tidur diganti setiap dua hari sekali agar tidak kotor dan berbau. Kandang yang disiapkan sebanyak tiga belas tempat tiap kandang terdiri dari 2 tikus yang diberi sekat kawat. Cara memasukannya yaitu dengan memegang badan tikus dan memasukan satu persatu dengan hati-hati ke dalam kandang agar tikus tidak merasa ketakutan dan stress karena takut dan stres dapat mempengaruhi kerja hormonal tikus.

3. Tikus diadaptasikan selama 7 hari dengan tujuan agar tikus menyesuaikan diri terhadap lingkungan yang baru (Arts *et al*, 2012). Selama masa ini tikus diberi makan BR-1, makanan yang diberikan pada tikus sebanyak 15gram/KgBB/hari. Makanan diberikan sekali sehari yaitu pagi dan sore hari. Jika ada sisa makanan, maka sisanya dibuang lalu diganti dengan yang baru, serta diberi minum aquadest.

4.5.1.2 Tahap pengelompokan tikus

1. Tikus yang sudah melewati tahap aklimatisasi selama tujuh hari, dikelompokkan ke dalam kelompok-kelompok perlakuan, di mana pengelompokan dilakukan secara acak. Di setiap kandang berisi tikus sebanyak 2 ekor dan kandang yang digunakan berjumlah sebanyak tiga belas buah. Setelah itu kandang diberikan label sesuai dengan perlakuan yaitu kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan I, perlakuan II, dan perlakuan III. Pengelompokan tikus perlakuan dibagi atas:

- a. Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain Wistar*) diberi pakan standar BR-1. Sebagai kelompok nilai MDA normal
- b. Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain Wistar*) diberi pakan standar BR-1+ isoniazid (10mg/200gBb/hari) dan rifampisin (10mg/200gBb/hari) (kontrol positif)
- c. Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain Wistar*) diberi pakan standar BR-1 + isoniazid (10mg/200gBb/hari) dan rifampisin (10mg/200gBb/hari) + ekstrak buah cepokak dosis 50mg/200gBB/hari (perlakuan I)

d. Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain Wistar*) diberi pakan standar BR-1 + isoniazid (10mg/200gBb/hari) dan rifampisin (10mg/200gBb/hari) + ekstrak buah cepokak dosis 100mg/200gBB/hari (perlakuan II)

e. Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain Wistar*) diberi pakan standar BR-1 + isoniazid (10mg/200gBb/hari) dan rifampisin (10mg/200gBb/hari) + ekstrak buah cepokak dosis 150mg/200gBB/hari (perlakuan III).

4.5.2 Pembuatan ekstrak buah cepokak (*Solanum torvum Swartz*)

1. Menimbang buah cepokak sesuai kebutuhan dosis 60 ml yaitu 6 kg buah segar.
2. Memotong buah cepokak menjadi bagian yang lebih kecil
3. Potongan buah cepokak dikeringkan dengan oven (2 hari) atau cahaya matahari (3-7 hari)
4. Kemudian buah yang sudah kering dihancurkan dan diayak
5. Hasil ayakan dimaserasi menggunakan methanol 100% dan didiamkan selama 24 jam
6. Kemudian disentrifuge 1000 rpm selama 20 menit dengan suhu 4 derajat celcius
7. Hasil maserasi kemudian disaring menggunakan kertas saring dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak sebanyak 60ml (Ramamurthy *et al*, 2012).

4.5.3 Penentuan dosis ekstrak buah cepokak (*Solanum torvum Swartz*)

Dasar perhitungan dosis efektif ekstrak buah cepokak (*Solanum torvum Swartz*) adalah dari penelitian Ramamurthy *et al* (2016) yang menggunakan dosis ekstrak buah cepokak sebesar 500 mg/kgBB/hari sebagai pencegahan terjadinya proses inflamasi dengan menggunakan tikus putih sebagai hewan coba.

$$\frac{X}{200} = \frac{500}{1000}$$

$$X = 100 \text{ mg/200grBB/hari}$$

Dosis ekstrak buah cepokak (*Solanum torvum Swartz*) yang digunakan dalam penelitian ini adalah 50 mg/200grBB/hari (Dosis I), 100 mg/200grBB/hari (Dosis II), dan 150 mg/200grBB/hari (Dosis III). Kemudian untuk menentukan dosis dalam ml (mililiter) yaitu dengan cara:

$$\rho \text{ (Massa Jenis)} = \frac{\text{massa}}{\text{volume}}$$

Dimana massa jenis ekstrak buah cepokak (*Solanum torvum Swartz*) diperoleh dari hasil pengukuran dengan menggunakan neraca analisis (piknometer). Kemudian volume di cari dengan rumus :

$$\text{Volume} = \frac{\text{massa}}{\rho}$$

4.5.4 Penentuan dosis isoniazid dan rifampisin

Dasar perhitungan dosis Isoniazid dan Rifampisin adalah penelitian Sulistyaningrum dan Pribadi (2010) yang menggunakan dosis sebesar 50 mg/KgBB/hari. Sehingga disesuaikan dengan berat badan tikus sebesar 200 gram menjadi:

$$\frac{X}{200} = \frac{50}{1000}$$

$$\begin{array}{rcl} 200 & & 1000 \\ X & = & 10 \text{ mg}/200\text{grBB}/\text{hari} \end{array}$$

Dosis Isoniazid dan Rifampisin yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10 mg/200grBB/hari dalam 2,5 mL aquades diberikan satu kali sehari selama 28 hari.

4.6 Pelaksanaan Perlakuan Penelitian

1. Peneliti mengambil tikus yang sudah dikelompokkan satu persatu secara hati-hati dan perlahan sehingga tikus tidak takut dan stress. Setelah itu tikus dipegang dengan cara memegang badan tikus dan menaruh bagian ekor serta menjepitnya pada jari antara kelingking dan jari manis, lalu menyalangkan kaki bagian depan tikus dan menjepitnya dengan jari antara jari telunjuk dan jari tengah, sedangkan posisi kepala agak ditengadahkan sehingga membuat tikus dalam posisi siap untuk diberi sonde.
2. Memberikan induksi isoniazid dan rifampisin menggunakan sonde peroral dengan dosis 10mg/200mg/hari sekali sehari, dimulai dari hari pertama sampai dengan hari ke-28
3. Memberikan ekstrak buah cepokak (*Solanum torvum Swartz*) secara peroral dengan sonde setiap hari selama 28 hari dengan dosis 50mg/200grBB/hari, 100mg/200grBB/hari, dan 150mg/200grBB/hari. Pemasukan sonde dilakukan ketika tikus melakukan gerakan menelan, sehingga sonde tidak melukai bagian dalam mulut tikus. Setelah sonde masuk sampai pada bagian esophagus, ekstrak buah cepokak (*Solanum torvum Swartz*) disondekan.

4.7 Tahap Pembedahan dan Pengukuran MDA

A. Tahap Anestesi

Tahap ini dilakukan dengan cara memasukan hewan coba ke dalam topless kaca yang sebelumnya telah diberi kapas yang mengandung kloroform. Pembiusan dilakukan satu persatu dengan harapan pembiusan dapat dilakukan secara inhalasi dengan dosis kloroform 0,67 ml/hewan coba selama 60 detik yang dihitung dengan menggunakan stopwatch. Hewan coba yang teranestesi ditandai dengan tidak adanya respon nyeri, kemudian hewan coba diletakan pada meja dan keempat kaki tikus difiksasi dengan menggunakan jarum pentul.

B. Tahap Pembedahan

Setelah hewan coba teranestesi dengan baik dan difiksasi menggunakan jarum pentul. Kemudian hewan coba dibedah dengan menggunakan gunting dari abdomen hingga setinggi leher, kemudian faring dipegang dan diiris dengan menggunakan pinset anatomis dan scalpel beserta mess, Hepar diekstraksi dari tubuh tikus kemudian disimpan dalam wadah kedap udara. Sediaan dapat disimpan dalam lemari pembeku hingga proses pengukuran dilakukan.

C. Tahap Pengukuran MDA

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan menggunakan *TBARS test di laboratorium Biomedik FK UMM*. Pada akhir perlakuan, organ hepar diekstraksi melalui pembedahan tikus. Hepar dihancurkan kemudian diambil sebanyak 1 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ml TCA 20% dingin, kemudian di vorteks dan disentrifuge

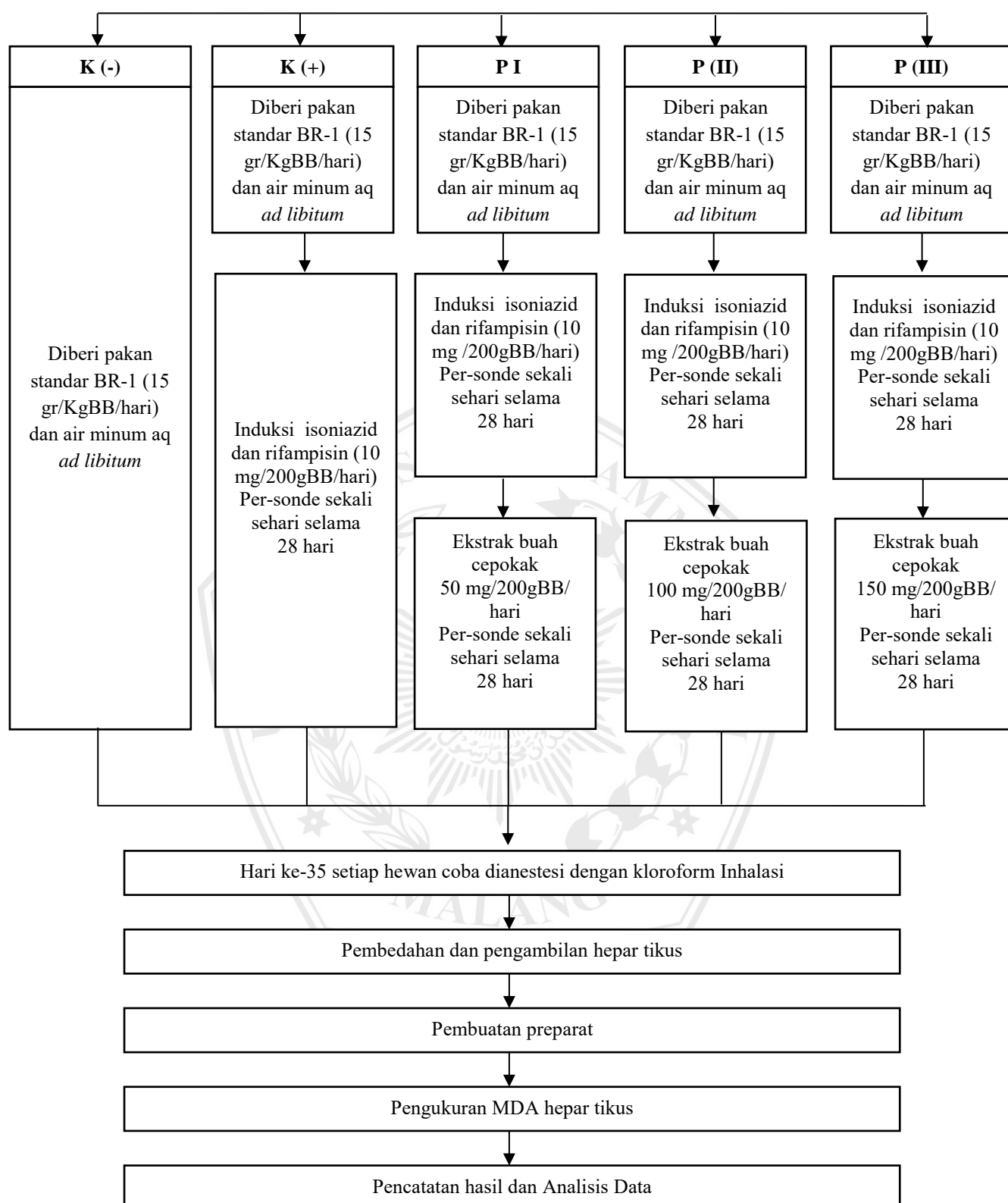
dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. *Supernatan* diambil, dimasukkan ke dalam tabung reaksi lain yang sudah berisi 2 ml TBA 0,67%, kemudian dilakukan *waterbath* selama 10 menit. Setelah itu tabung reaksi dikeluarkan dan didinginkan. Hasil reaksi diambil sebanyak 1 ml dimasukkan dalam kuvet dan dibaca serapannya pada panjang gelombang 532 nm (Yustika AR, Aulanni'am, Prasetyawan S, 2013)..

4.8 Penanganan Hewan Coba Setelah Pembedahan

Setelah hewan coba dibedah dan diambil heparnya, harus dipastikan bahwa hewan coba tersebut tidak mengalami *recovery*. Sebelum mengubur, hewan coba harus dipastikan bahwa denyut nadi hewan coba sudah berhenti. Jika hewan coba mengalami *recovery*, maka harus dilakukan prosedur euthanasia, salah satunya adalah prosedur *Cervical Dislocation*.. Teknik ini dilakukan dengan memberikan tekanan pada bagian posterior dasar tulang tengkorak dan vertebrae. Bila vertebrae terpisah dari otak, reflek kedip akan menghilang, rasa nyeri akan menghilang sehingga hewan tersebut tidak merasakan sakit. Selanjutnya hewan coba yang sudah dipastikan mati, dikumpulkan menjadi satu dibungkus polibag dan dikubur sedalam 1 m dan jarak minimal 250 m dari sumber air (INSA, 2000; SEPA, 2009).

4.9 Alur Penelitian

Adaptasi 25 hewan coba selama tujuh hari



4.10 Analisis Data

Penelitian ini diawali dengan uji normalitas *Saphiro-Wilk* dan uji homogenitas *Levene*, apabila sebaran data normal dan varian data sama maka digunakan uji One Way Anova, kemudian uji Post Hoc Bonferroni, lalu dilanjutkan uji Regresi Linier Sederhana dengan menggunakan aplikasi SPSS 22.

a. Uji One Way Anova

Uji One Way Anova dilakukan setelah didapatkan sebaran data normal (uji normalitas dengan nilai $\text{sig} > 0,05$) dan varian sama (uji homogenitas dengan nilai $\text{sig} > 0,05$). Uji One Way Anova dilakukan untuk membuktikan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan, hasil uji dikatakan ada perbedaan yang bermakna jika $p < 0,05$. Akan tetapi, jika pada uji normalitas didapatkan hasil sebaran data tidak normal, maka uji analisis data yang digunakan adalah Kruskal-Wallis dan Post Hoc Mann-Whitney.

b. Uji Post Hoc

Uji Post Hoc Bonferroni merupakan uji lanjutan dari uji One Way Anova, digunakan bila didapatkan sebaran data normal dan varian sama. Uji Post Hoc Bonferroni dilakukan untuk mengetahui perbedaan yang bermakna antar kelompok dalam penelitian. Namun, jika didapatkan hasil dari uji homogenitas didapatkan varian data yang berbeda maka menggunakan uji Post Hoc Tamhane.

c. Uji Regresi Linier Sederhana

Uji Regresi Linier Sederhana digunakan untuk mengetahui besar pengaruh variabel bebas terhadap variabel terikat, uji ini dilakukan untuk memprediksi penggunaan dosis (dalam 1 mg) terhadap kadar MDA hepar tikus. Prediksi ini dapat diketahui dari persamaan $Y=a+bX$. Karena dalam penelitian ini hanya diteliti variabel dosis maka untuk mengetahui konstribusi variabel tersebut dalam mempengaruhi kadar MDA hepar tikus dapat diketahui dari adjustif R^2 .

